

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 29 713.4

Anmeldetag: 02. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Polycarbonsäure-Derivate, Verfahren zu ihrer
Herstellung und ihre Verwendung

IPC: C 07 C, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 06. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Beschreibung:

5 Polyencarbonsäure-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten wird eine große Zahl von Antibiotika therapeutisch eingesetzt. Die Krankheitserreger werden aber zunehmend resistent gegen die verwendeten Arzneimittel, und es droht sogar eine große Gefahr durch sogenannte multiresistente Keime, die nicht nur gegen einzelne Antibiotika-
10 gruppen, wie z.B. β -Lactam-Antibiotika, Glycopeptide oder Macrolide widerstandsfähig geworden sind, sondern gleichzeitig mehrere Resistenzen tragen. Es gibt sogar Krankheitserreger, die gegen alle im Handel erhältlichen Antibiotika resistent geworden sind. Infektionskrankheiten, die durch solche Keime verursacht werden,
15 sind nicht mehr therapierbar. Deshalb gibt es einen großen Bedarf an neuen Mitteln, die gegen resistente Keime eingesetzt werden können. Es sind zwar in der Literatur viele Tausend Antibiotika beschrieben worden, die meisten sind jedoch zu toxisch, um als Arzneimittel eingesetzt werden zu können.

20 Es wurde bereits eine größere Anzahl von Polyen-Antibiotika beschrieben, von denen die meisten zum makrocyclischen Strukturtypus gehören. Diese Makrolide wirken antimykotisch durch Wechselwirkungen mit biologischen Membranen und sind daher gegen Warmblüter toxisch. Der wichtigste Vertreter diesen Typs ist das Amphotericin B, das trotz seiner Toxizität als Humantherapeutikum eingesetzt wird.
25 Als nicht-makrocyclisches Polyen-Antibiotikum wurde zum Beispiel das Serpentin (Ritzau et al., Liebigs Ann. Chem. 1993, 433-435) beschrieben, das einen in 1,2-Position mit Polyenseitenketten substituierten Phenylring enthält. Serpentin zeigte in Tests gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien ausschliesslich gegen *Bacillus subtilis* eine schwache antibiotische Wirkung.

30

Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien ist unter anderem aus Murein aufgebaut, das aus N-Acetyl-D-Glukosamin und N-Acetylmuraminsäure, die disaccharidähnlich untereinander verbunden sind, aufgebaut ist und Aminosäuren sowie Peptide wie zum Beispiel D-Glutamin, D- und L-Alanin, L-Lysin und Pentaglycyl-Einheiten

enthält, und das stark vernetzt ist. Die Biosynthese der bakteriellen Zellwand geschieht mit Hilfe von Enzymen, die im Stoffwechsel von Warmblütern nicht vorkommen. Daher sind solche Enzyme geeignete Angriffsorte für die Entwicklung von für Warmblüter gut verträglichen Antibiotika, und Inhibitoren der

- 5 Mureinbiosynthese sollten für Menschen ungiftig sein. Ein Schlüsselenzym Peptidoglycanbiosynthese, und damit des Zellwandaufbaus, ist die Glycosyltransferase (Transglycosylase, GT). Ein spezifischer Inhibitor dieses Enzyms, das Moenomycin (Kurz et al., Eur. J. Biochem. 1998, 252, 500-507), ist bereits seit längerer Zeit bekannt. Das Moenomycin ist ein sehr stark wirksames
- 10 Antibiotikum, welches gut verträglich ist, es wird jedoch aus dem Magen-Darm-Trakt nicht resorbiert und auch die Ausscheidung aus dem Blut nach intravenöser Gabe ist gestört, so daß eine systemische Anwendung in der Medizin bislang unterbleiben musste. Es sind später nur sehr wenige weitere Glycosyltransferase-Inhibitoren in der Literatur beschrieben worden, aus Gründen der Pharmakokinetik oder der
- 15 Verträglichkeit fand keines dieser Agenzien den Weg in die Therapie. Es werden daher neuartige GT-Inhibitoren weiterhin gesucht, wie es in neuerer Zeit von Goldman & Gange in Current Medicinal Chem. 2000, 7, 801-820, berichtet wurde. Das Screening geschieht mit spezifischen biochemischen GT-Testsystemen. Solche Assays sind wiederholt beschrieben wurden, wie z.B. von Vollmer & Höltje in
- 20 Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000, 44, 1181-1185.

Darby et al. (J. Org. Chem. 1977, 42, 1960-1967) beschreiben die Synthese von in 1,2-Position mit trans-Polyenseitenketten substituierte Phenylverbindungen zur Untersuchung des π -Systems von makrozyklischen Annulen.

25

Es wurde überraschend gefunden, daß der Stamm *Actinomycetales* sp. DSM 14865 neuartige Verbindungen zu bilden vermag, die sehr gute Inhibitoren der Glycosyltransferase und sehr wirksame antibakterielle Verbindungen sind.

- 30 Gegenstand der Erfindung sind demzufolge die von dem Stamm, *Actinomycetales* sp. DSM 14865, gebildeten Wirkstoffe sowie deren physiologisch verträglichen Salze, Ester, Ether und offensichtliche chemische Äquivalente.

C₁-C₆-Alkyl bedeutet eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 6 C-Atomen, bevorzugt mit 1 bis 4 C-Atomen, wie z.B. Methyl, Ethyl, i-Propyl, tert. Butyl und Hexyl.

- 5 C₂-C₆-Alkenyl bedeutet eine geradkettige oder verzweigte Alkenylgruppe mit 2 bis 6 C-Atomen, das einfach, zweifach oder dreifach ungesättigt ist, wie z.B. Allyl, Crotyl, 1-Propenyl, Penta-1,3-dienyl und Pentenyl.

- 10 C₂-C₆-Alkynyl bedeutet eine geradkettige oder verzweigte Alkynylgruppe mit 2 bis 6 C-Atomen, das einfach oder zweifach ungesättigt ist, wie z.B. Propinyl, Butinyl und Pentinyl.

- 15 C₅-C₁₄-Aryl bedeutet eine Arylgruppe mit 5 bis 14 C-Atomen, wie z.B. Phenyl oder 1-Naphthyl oder 2-Naphthyl, die unsubstituiert oder substituiert ist mit Halogen, C₁-C₆-Alkyl, vorzugsweise C₁-C₄-Alkyl, beispielsweise Methyl-, Hydroxy-, -O-C₁-C₆-Alkyl, vorzugsweise -O-C₁-C₄-Alkyl, beispielsweise Methoxy, oder Trifluormethyl.

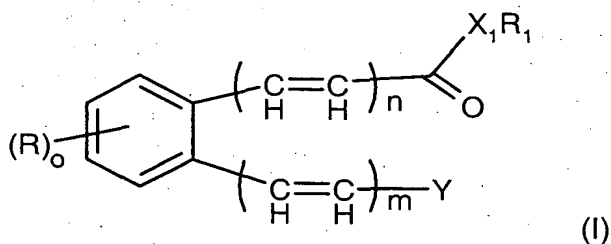
- 20 Aliphatische Acylgruppen -N[-C(=O)-(C₁-C₆-Alkyl)]- enthalten vorzugsweise eine vorzugsweise C₁-C₄-Alkyl und sind beispielsweise Formyl, Acetyl, Propionyl, Butyryl, Hexanoyl, Acryloyl, Crotonoyl, Propioloyl, und können weiter substituiert sein durch Halogen, z.B. Chlor, Brom, Fluor, durch NH₂, und/oder durch -NH(C₁-C₆-Alkyl), vorzugsweise -NH(C₁-C₄-Alkyl), beispielsweise Methyl- oder Ethylamino.

- 25 Aromatisches Acyl -N[-C(=O)-(C₅-C₁₄-Aryl)]- sind beispielsweise N-Benzoyl oder N-Naphthoyl, und können weiter substituiert sein durch Halogen, wie Chlor, Brom, Fluor, durch C₁-C₆-Alkyl, vorzugsweise C₁-C₄-Alkyl, beispielsweise Methyl, durch Hydroxy-, durch -NH(C₁-C₆-Alkyl), vorzugsweise -NH(C₁-C₄-Alkyl), beispielsweise Methyl- oder Ethylamino, oder -O-C₁-C₆-Alkyl, vorzugsweise -O-C₁-C₄-Alkyl, beispielsweise Methoxy.

- 30 Halogen bedeutet ein Element der 7. Hauptgruppe des Periodensystems, vorzugsweise Chlor, Brom, Fluor.

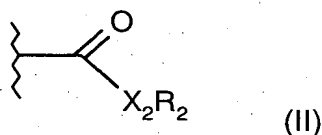
Die Konfiguration der Doppelbindungen in den Polyengruppen der Verbindungen der Formel (I) kann, wenn nicht anders angegeben, in der *cis*- oder in der *trans*-

Gegenstand der Erfindung ist demgemäß eine Verbindung der Formel (I)

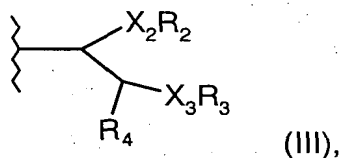


5 wobei

Y eine Gruppe der Formel (II)



10 oder der Formel (III)



R

H, C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl oder C₅-C₁₄-Aryl, Halogen, -CN, -OH, -O-C₁-C₆-Alkyl, -O-C₂-C₆-Alkenyl, -O-C₅-C₁₄-Aryl, -O-C₂-C₆-Alkynyl, -NH₂, -NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-C₂-C₆-Alkynyl, -NH-C₅-C₁₄-Aryl, -N(-C₁-C₆-Alkyl)₂, -N(-C₂-C₆-Alkenyl)₂, -N(-C₂-C₆-Alkynyl)₂, -N(C₅-C₁₄-Aryl)₂, -NH[-C(=O)-(C₁-C₆-Alkyl)], -NH[-C(=O)-(C₅-C₁₄-Aryl)], -NH-O-R₁, -SH, -S-C₁-C₆-Alkyl, -S-C₂-C₆-Alkenyl, -S-C₁-C₆-Alkynyl oder -O-C₅-C₁₄-Aryl ist, wobei die oben genannten Substituenten

20 unsubstituiert oder einfach oder mehrfach substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl oder C₅-C₁₄-Aryl, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl unsubstituiert oder ein- oder zweifach substituiert sind durch -OH, =O, -O-C₁-C₆-Alkyl, -O-C₂-C₆-Alkenyl, -O-C₅-C₁₄-Aryl, -C₅-C₁₄-Aryl, -NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-C₂-C₆-Alkenyl, -NH₂, Halogen, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl weiter substituiert sein

25 können durch eine -CN, Amid oder Oxim,

R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander

H, C_1 - C_6 -Alkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl, C_2 - C_6 -Alkynyl oder C_5 - C_{14} -Aryl bedeuten,

worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl unsubstituiert oder ein- oder zweifach

substituiert sind durch $-OH$, $-O-C_1-C_6$ -Alkyl, $-O-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-O-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-C_5$ -

- 5 C_{14} -Aryl, $-NH-C_1-C_6$ -Alkyl, $-NH-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-NH_2$ oder Halogen, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl unsubstituiert oder ein- oder zweifach substituiert sind durch $-OH$, $=O$, $-O-C_1-C_6$ -Alkyl, $-O-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-O-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-NH-C_1-C_6$ -Alkyl, $-NH-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-NH_2$, Halogen, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl weiter substituiert sein können durch eine $-CN$, Amid oder Oxim,

10

X_1 , X_2 und X_3 unabhängig voneinander

$-CH_2-$, $-CHR-$, $-NH-$, $-N(C_1-C_6-Alkyl)-$, $-N(C_2-C_6-Alkenyl)-$, $-N(C_2-C_6-Alkynyl)-$,
 $-N[-C(=O)-(C_1-C_6-Alkyl)]-$, $-N[-C(=O)-(C_5-C_{14}-Aryl)]-$, $-N(C_5-C_{14}-Aryl)-$, $-N(O-R)-$,
 $-O-$ oder $-S-$ sind,

15

n und m unabhängig voneinander

2, 3, 4 oder 5 sind, und

o

- 20 0, 1, 2 oder 3 ist,

wobei Verbindungen der Formel (I) ausgenommen sind, in denen

o gleich 0,

n gleich 2,

- 25 m gleich 2 oder 3,

X_2 und X_3 gleich O und

R_2 und R_3 gleich C_2H_5 sind,

und alle Doppelbindungen die trans-Konfiguration besitzen,

- 30 und/oder eine stereoisomere Form der Verbindung der Formel (I) und/oder ein Gemisch dieser Formen in jedem Verhältnis, und/oder ein physiologisch verträgliche Salze der Verbindung der Formel (I).

Konfiguration vorliegen. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Verbindungen als auch Stereoisomerengemische, wie Enantiomerengemische und Diastomerengemische, in jedem Verhältnis. Unter stereoisomeren Formen werden insbesondere Verbindungen mit unterschiedlichen räumlichen Anordnungen (Konfigurationen) der

5 Atome oder Atomgruppen in einem Molekül bei gleichartiger Verkettung der Atome verstanden, zum Beispiel *cis-trans* Isomere an Doppelbindungen.

Vorzugsweise enthält mindestens eine Polyengruppe in der Verbindung der Formel (I) mindestens eine *cis*-Doppelbindung.

10

R ist vorzugsweise H.

R₁, R₂, R₃ und R₄ sind unabhängig voneinander vorzugsweise H oder C₁-C₆-Alkyl.

X₁, X₂ und X₃ sind unabhängig voneinander vorzugsweise -O-.

m ist vorzugsweise 3 oder 4.

15

n ist vorzugsweise 2.

o ist vorzugsweise 0.

Die allgemeinen Definitionen der Reste und die bevorzugten Definitionen der Reste R, R₁, R₂, R₃ und R₄, X₁, X₂ und X₃, m, n und o in den Verbindungen der Formel (I)

20 können unabhängig voneinander beliebig miteinander kombiniert werden.

Bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (I), wobei

R gleich H,

R₁ gleich H oder C₁-C₆-Alkyl,

25

R₂ gleich H oder C₁-C₆-Alkyl,

R₃ gleich H oder C₁-C₆-Alkyl,

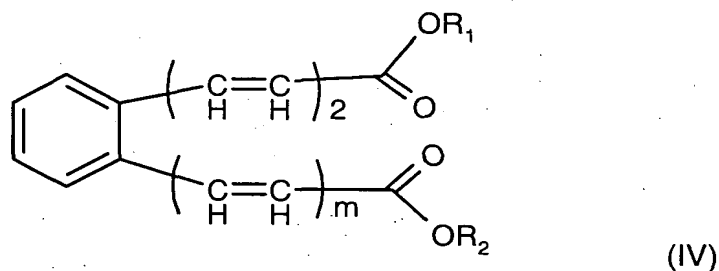
R₄ gleich C₁-C₆-Alkyl, und

X₁ und X₂ gleich -O- sind,

sowie deren physiologisch verträglichen Salze.

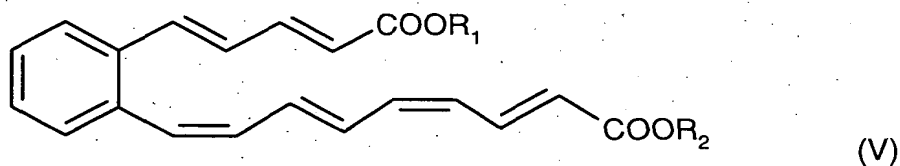
30

Bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (I), gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (IV)



wobei m 3 oder 4 ist, sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

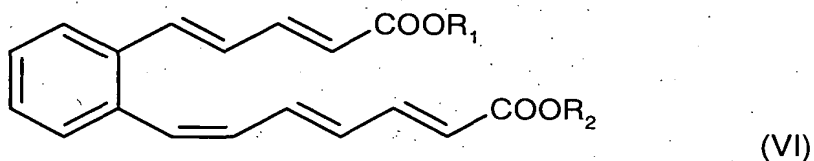
- 5 Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (IV), in der m gleich 4 ist, und in denen die Konfiguration der Polyene der Formel (V) entspricht:



- 10 Speziell bevorzugt ist eine Verbindung der Formel (V), in der R_1 und R_2 gleich H sind. Diese Verbindung wird im folgenden als Serpente mycin A (Summelformel: $C_{20}H_{18}O_4$; MG = 322.36) bezeichnet.

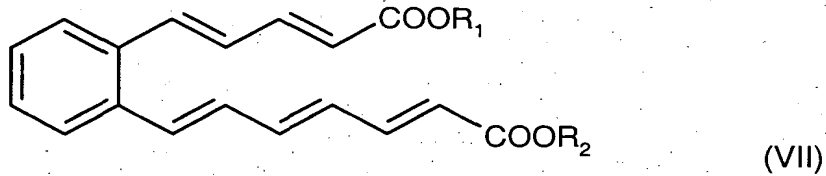
Ferner besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (IV),

- 15 in der n gleich 2 und m gleich 3 ist, und in denen die Konfiguration der Polyene der Formel (VI) entspricht:



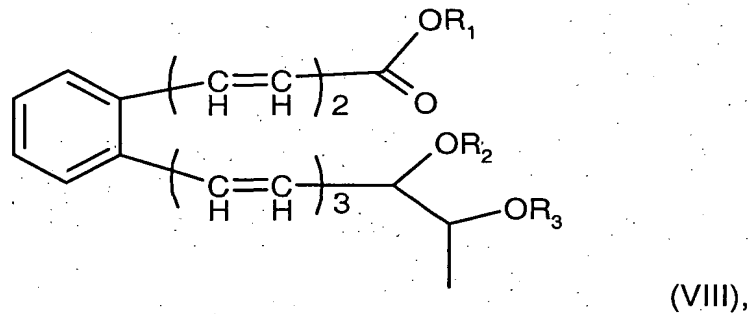
- 20 Speziell bevorzugt ist eine Verbindung der Formel (VI), in der R_1 und R_2 gleich H sind. Diese Verbindung wird im folgenden als Serpente mycin B (Summelformel: $C_{18}H_{16}O_4$; MG = 296.33) bezeichnet.

Weiterhin besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (IV), in der n gleich 2 und m gleich 3 ist, und in denen die Konfiguration der Polyene der Formel (VII) entspricht:



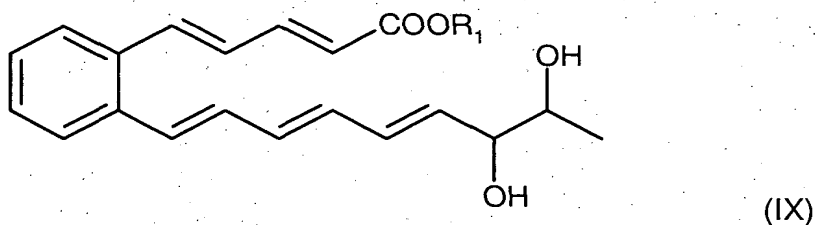
Speziell bevorzugt ist eine Verbindung der Formel (VII), in der R₁ und R₂ gleich H sind. Diese Verbindung wird im folgenden als Serpentemycin C (Summelformel: C₁₈H₁₆O₄; MG = 296.33) bezeichnet.

Bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (I), gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (VIII)



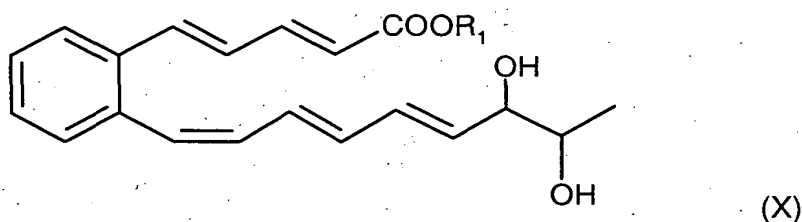
15 sowie deren physiologisch verträglichen Salze.

Ferner besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (VIII), in der R₂ und R₃ gleich H sind, und in denen die Konfiguration der Polyene der Formel (IX) entspricht:



Speziell bevorzugt ist eine Verbindung der Formel (IX), in der R_1 gleich H ist. Diese Verbindung wird im folgenden als Serpente mycin D (Summelformel: $C_{20}H_{22}O_4$; MG = 236.40) bezeichnet.

- 5 Ferner besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (VIII), in der R_2 und R_3 gleich H sind, und in denen die Konfiguration der Polyene der Formel (X) entspricht:



Speziell bevorzugt ist eine Verbindung der Formel (X), in der R_1 gleich H ist. Diese Verbindung wird im folgenden als Serpente mycin E bezeichnet.

Die Erfindung betrifft ferner eine Verbindung der Summenformel $C_{20}H_{18}O_4$

- 15 (Serpente mycin A), $C_{18}H_{16}O_4$ (Serpente mycin B und C) oder $C_{20}H_{22}O_4$ (Serpente mycin D) erhältlich durch Fermentierung von *Actinomyces* sp. DSM 14865 oder einer ihrer Varianten und/oder Mutanten in einem Kulturmedium bis sich die Verbindungen Serpente mycin A, B, C und/oder D in der Kulturlösung anhäuft, und durch anschließende Isolierung der Verbindung, sowie gegebenenfalls Überführung in ein pharmakologisch verträgliches Salz.

Die Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel (I), erhältlich durch Fermentierung von *Actinomyces* sp. DSM 14865 bzw. einer ihrer Varianten und/oder Mutanten in einem Kulturmedium, bis sich eine oder mehrere der Verbindungen

- 25 Serpente mycin A, B, C und/oder D in der Kulturbrühe anhäuft, anschließende Isolierung der Verbindung, gegebenenfalls Überführung in ein chemisches Derivat, sowie gegebenenfalls Überführung in ein pharmakologisch verträgliches Salz.

Durch die angegebenen Strukturformeln unterscheiden sich die Serpentemycine A, B, C und D von literaturbekannten Substanzen. Es sind zwar strukturverwandte Polyencarbonsäure-Derivate bekannt, sie unterscheiden sich jedoch durch ihre chemische Struktur, die antimikrobielle beziehungsweise biochemische Wirksamkeit und durch weitere physikalischen Eigenschaften von den erfindungsgemäßen Verbindungen.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel (I), dadurch gekennzeichnet, daß

1. der Mikroorganismus *Actinomycetales* sp. DSM 14865 bzw. einer ihrer Varianten und/oder Mutanten in einem wäßrigen Nährmedium kultiviert wird, bis sich eine oder mehrere der Verbindungen Serpentemycin A, B, C und/oder D in der Kulturbrühe anhäuft,
2. Serpentemycin A, B, C oder D isoliert und gereinigt wird,
3. Serpentemycin A, B, C oder D gegebenenfalls mit einem geeigneten Reagenz in eine Verbindung der Formel (I) überführt wird,
4. und die Verbindung der Formel (I) gegebenenfalls in ein pharmakologisch verträgliches Salz überführt wird.

Geeignete Reagenzien sind beispielsweise Alkylierungsmittel, mit denen Carboxylgruppen der Serpentomycine A, B, C und D zu dem entsprechenden Ester umgesetzt werden können. Alkylierende Agenzien sind zum Beispiel Methyljodid, Diethylsulfat, Diazomethan oder andere Alkyl-Derivate, wie sie beispielsweise von Jerry March im Buch *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, 4th Edition, 1992, beschrieben worden sind. Doppelbindungen können beispielsweise photochemisch oder unter Zusatz eines Radikalbildners isomerisiert werden. Um Umsetzungen selektiv durchzuführen, kann es vorteilhaft sein vor der Reaktion geeignete, in an sich bekannter Weise, Schutzgruppen einzuführen. Die Schutzgruppen werden nach der Reaktion abgespaltet und anschließend wird das Reaktionsprodukt gereinigt.

Die Erfindung betrifft darüber hinaus offensichtliche chemische Äquivalente der Verbindungen der Formel (I). Offensichtliche chemische Äquivalente sind Verbindungen, die einen geringfügigen chemischen Unterschied aufweisen, also die

gleiche Wirksamkeit haben oder sich unter milden Bedingungen in die erfindungsgemäßen Verbindungen umwandeln. Zu den genannten Äquivalenten gehören z.B. Ester, Amide, Hydrazide, Anhydride, Hydrierungsprodukte, Reduktionsprodukte, Komplexe oder Addukte der bzw. mit den erfindungsgemäßen Verbindungen.

Eine Verbindung der Formel (I) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden in die entsprechenden pharmakologisch verträglichen Salze übergeführt werden. Unter pharmakologisch verträglichen Salzen der erfindungsgemäßen Verbindungen versteht man sowohl anorganische als auch organische Salze, wie sie in Remingtons Pharmaceutical Sciences (17. Auflage, Seite 1418 [1985]) beschrieben sind. Als Salze kommen insbesondere Alkali-, Ammonium-, Erdalkalisalze, Salze mit physiologisch verträglichen Aminen und Salze mit anorganischen oder organischen Säuren wie z. B. HCl, HBr, H₂SO₄, Maleinsäure, Fumarsäure in Frage.

Der Stamm *Actinomycetales* sp. DSM 14865 bildet auf Glukose-, Stärke-Hefeextrakt- oder Glycerin-haltigen Nährlösungen die Verbindungen Serpentemycine A, B, C und D.

Actinomycetales sp. DSM 14865 bildet darüberhinaus zahlreiche Nebenprodukte mit geringfügig variierten Polyenketten.

Ein Isolat von *Actinomycetales* sp. wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Deutschland nach den Regeln des Budapester Vertrages am 18.03.2002 unter der Nummer DSM 14865 hinterlegt.

Actinomycetales sp. DSM 14865 besitzt ein braunbeiges Substratmycel und spärliches Luftmycel auf Haferflockenmedium. Er bildet in Kultur keine für die *Actinomyceten* charakteristischen Fruchtkörper.

Das besagte Verfahren umfasst die Kultivierung von *Actinomycetales* sp. DSM 14865, seiner Mutanten und/oder Varianten unter aeroben Bedingungen in eine

Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, anorganischen Salze und gegebenenfalls Spurenelemente enthaltenden Kulturmedien.

Anstelle des Stammes *Actinomycetales* sp. DSM 14865 können auch deren
 5 Mutanten und Varianten eingesetzt werden, soweit sie die erfindungsgemäßen Verbindungen synthetisieren.

Eine Mutante ist ein Mikroorganismus, in dem ein oder mehrere Gene des Genoms modifiziert wurden, wobei das Gen oder die Gene funktionell und vererbbar erhalten
 10 bleiben, die für die Fähigkeit des Organismus verantwortlich sind, die erfinderische Verbindung zu produzieren.

Solche Mutanten können in an sich bekannter Weise durch physikalische Mittel, beispielsweise Bestrahlung, wie mit Ultraviolett- oder Röntgenstrahlen, oder
 15 chemische Mutagene, wie beispielsweise Ethylmethansulfonat (EMS); 2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon (MOB) oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) erzeugt werden, oder wie von Brock et al. in "Biology of Microorganisms", Prentice Hall, Seite 238-247 (1984) beschrieben.

Eine Variante ist ein Phenotyp des Mikroorganismus. Mikroorganismen haben die Fähigkeit, sich an ihre Umgebung anzupassen und zeigen daher ausgeprägte physiologische Flexibilität. Bei der phenotypischen Anpassung sind alle Zellen des Mikroorganismus involviert, wobei die Art der Veränderung nicht genetisch
 20 konditioniert ist und unter veränderten Bedingungen reversibel ist (H. Stolp, Microbial ecology: organismus, habitats, activities. Cambridge University Press, Cambridge, GB, Seite 180, 1988).

Das Screening nach Mutanten und Varianten, die das erfindungsgemäße Antibiotikum produzieren, kann durch Bestimmung der biologischen Aktivität des
 30 in der Kulturbrühe angehäuften Wirkstoffes, beispielsweise durch Bestimmung der antibakteriellen Wirkung erfolgen, oder durch Detektion von Verbindungen, die als antibakteriell aktiv bekannt sind, in der Fermentationsbrühe durch beispielsweise HPLC-oder LC-MS-Methoden.

Als bevorzugte Kohlenstoffquellen für die Fermentation eignen sich assimilierbare Kohlenhydrate und Zuckeralkohole, wie Glukose, Laktose, Saccharose oder D-Mannit sowie kohlenhydrathaltige Naturprodukte, wie z.B. Malzextrakt oder Hefextrakt. Als Stickstoffquelle kommen in Betracht: Aminosäuren, Peptide und

- 5 Proteine sowie deren Abbauprodukte, wie Casein, Peptone oder Tryptone, ferner Fleischextrakte, Hefeextrakte, gemahlene Samen, beispielsweise von Mais, Weizen, Bohnen, Soja oder der Baumwollpflanze, Destillationsrückstände der Alkoholherstellung, Fleischmehle oder Hefeextrakte, aber auch Ammoniumsalze und Nitrate, insbesondere aber auch synthetisch bzw. biosynthetisch gewonnene
- 10 Peptide. An anorganischen Salzen und Spurenelemente kann die Nährlösung beispielsweise Chloride, Carbonate, Sulfate oder Phosphate der Alkali- oder Erdalkalimetalle, Eisen, Zink, Kobalt und Mangan enthalten.

- Die Bildung der erfindungsgemäßen Verbindungen verläuft besonders gut z.B. in
- 15 einer Nährlösung, die etwa 0,05 bis 5 %, bevorzugt 0,5 bis 2 % Stärke, 0,05 bis 3 %, bevorzugt 0,1 bis 1 % Hefeextrakt, 0,05 bis 5 %, bevorzugt 0,1 bis 2 % Glucose, 0,2 bis 5 %, bevorzugt 0,5 % bis 2 % Glycerin, 0,05 bis 3 %, bevorzugt 0,1 bis 1 % Consteep, 0,05 bis 3 %, bevorzugt 0,1 bis 1 % Pepton, 0,05 bis 3 %, bevorzugt 0,05 bis 0,5 % NaCl und 0,05 bis 3 %, bevorzugt 0,1 bis 1 % CaCO_3 enthält. Die Angaben
- 20 in Prozent sind jeweils bezogen auf das Gewicht der gesamten Nährlösung.

- In der Nährlösung bildet *Actinomycetales* sp. DSM 14865 ein Gemisch aus den Serpetemycinen A, B, C und D und Nebenprodukten. Je nach Zusammensetzung der Nährlösung kann der mengenmäßige Anteil einer oder mehrerer der
- 25 erfindungsgemäßen Verbindungen variieren. Außerdem kann durch die Medienzusammensetzung die Synthese einzelner Polyencarbonsäuren gesteuert werden, so daß ein Antibiotikum gar nicht bzw. in einer Menge unterhalb der Nachweisgrenze vom Mikroorganismus hergestellt wird.

- 30 Die Kultivierung des Mikroorganismus erfolgt aerob, also beispielsweise submers unter Schütteln oder Rühren in Schüttelkolben oder Fermentern oder auf Festmedium, gegebenenfalls unter Einführen von Luft oder Sauerstoff. Sie kann in einem Temperaturbereich von etwa 15 bis 35°C, vorzugsweise bei etwa 25 bis 32°C, insbesondere bei 27 bis 30°C durchgeführt werden. Der pH-Bereich sollte zwischen

4 und 10 liegen, vorzugsweise zwischen 6.5 und 7.5. Man kultiviert den Mikroorganismus unter diesen Bedingungen im allgemeinen über einen Zeitraum von 48 bis 720 Stunden, vorzugsweise 72 bis 320 Stunden. Vorteilhaft kultiviert man in mehreren Stufen, d.h. man stellt zunächst eine oder mehrere Vorkulturen in einem flüssigen Nährmedium her, die dann in das eigentliche Produktions-medium, die Hauptkultur, beispielsweise im Volumenverhältnis 1:10-1:100, überimpft werden. Die Vorkultur erhält man z.B., indem man das Mycel in eine Nährlösung überimpft und etwa 20 bis 120 Stunden, bevorzugt 48 bis 72 Stunden, wachsen läßt. Das Mycel kann beispielsweise erhalten werden, indem man den Stamm etwa 1 bis 40 Tage, bevorzugt 14 bis 21 Tage, auf einem festen oder flüssigen Nährboden, beispielsweise Hefe-Malz-Glukose-Agar, Haferflocken-Agar oder Stärke-Agar, wachsen läßt.

Der Fermentationsverlauf und die Bildung der erfindungsgemäßen Antibiotika kann entsprechend dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. durch Austestung der biologischen Aktivität in Bioassays oder durch chromatographische Methoden wie Dünnschichtchromatographie (DC) oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verfolgt werden.

Der *Actinomycetales* sp. DSM 14865 kann die erfindungsgemäßen Verbindung durch Submersfermentation bilden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können sowohl im Mycel als auch im Kulturfiltrat vorkommen, gewöhnlich befindet sich die Hauptmenge im Kulturfiltrat. Es ist deshalb zweckmäßig, die Fermentationslösung durch Filtration oder Zentrifugation zu trennen. Das Filtrat wird mit einem Adsorptionsharz als feste Phase extrahiert. Das Mycel, aber auch die Oberflächenkultur wird zweckmäßiger Weise mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert, beispielsweise Methanol oder Propanol-2.

Die Extraktion kann in einem weiten pH-Bereich durchgeführt werden, es ist jedoch zweckmäßig, im neutralen oder schwach sauren Milieu, vorzugsweise zwischen pH 3 und pH 7 zu arbeiten. Die Extrakte können z.B. im Vakuum konzentriert und getrocknet werden.

Eine Methode der Isolierung des erfindungsgemäße Antibiotikums ist die Lösungsverteilung in an sich bekannter Weise.

5 Eine andere Methode der Reinigung ist die Chromatographie an Adsorptionsharzen wie z.B. an Diaion® HP-20 (Mitsubishi Casei Corp., Tokyo, Japan), an Amberlite® XAD 7 (Rohm and Haas, USA), an Amberchrom® CG (Toso Haas, Philadelphia, USA) oder an ähnlichen. Geeignet sind darüber hinaus zahlreiche Reverse-Phase Träger, z.B. RP₈ und RP₁₈, wie sie z.B. im Rahmen der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) allgemein bekannt geworden sind.

10 Eine weitere Reinigungsmöglichkeit für das erfindungsgemäße Antibiotikum besteht in der Verwendung von sog. Normal-Phasen-Chromatographie-Trägern, wie z.B. Kieselgel oder Al₂O₃ oder anderen in an sich bekannter Weise.

15 Ein alternatives Isolierungsverfahren ist die Verwendung von Molekularsieben, wie z.B. Fractogel® TSK HW-40 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Sephadex® G-25 (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) und andere, in an sich bekannter Weise. Es ist darüber hinaus auch möglich, aus angereichertem Material die neuen Polyencarbonsäuren durch Kristallisation zu gewinnen. Geeignet hierzu sind z.B.
20 organische Lösungsmittel und ihre Gemische, wasserfrei oder mit Wasserzusatz oder verschiedene Salze. Ein zusätzliches Verfahren zur Isolierung und Reinigung der erfindungsgemäßen Antibiotika besteht in der Verwendung von Anionenaustauschern, vorzugsweise im pH-Bereich von 4 bis 10. Besonders geeignet ist hierfür die Verwendung von Pufferlösungen, denen man Anteile von organischen
25 Lösungsmitteln hinzugefügt hat.

Es wurde überraschend gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen starke Inhibitoren der Glycosyltransferase sind. Selektive und starke Hemmstoffe der Glycosyltransferase, wie zum Beispiel die Antibiotika der Moenomycingruppe,
30 weisen stets antibakterielle Wirkungen auf, wobei eine geringe Inhibitor-Konzentration (IC₅₀) mit starker bakteriostatischer Aktivität einhergeht. Die erfindungsgemäßen Verbindungen wirken bakteriostatisch, weil sie das Wachstum und Vermehrung der Bakterien hemmen, sie eignen sich daher zur Therapie von Erkrankungen, die durch bakterielle Infektionen verursacht werden. Tabelle 1 faßt

die Inhibitor-Konzentrationen (IC_{50}) von einigen erfindungsgemäßen Verbindungen beispielhaft zusammen. Um spezifische und sehr wirksame Glycosyltransferase-Inhibitoren zu finden, wurde ein spezielles Testsystem angewandt. Hierbei wird ein Glycosyltransferase / 3H -Moenomycin-Komplex eingesetzt und mit zu prüfenden Substanzen zusammengebracht. Die Bestimmung der GT-inhibitorischen Wirkung beruht auf dem Verdrängen von radioaktiv markiertem Moenomycin A aus dem Glycosyltransferase (PBP 1b) / 3H -Moenomycin-Komplex, wobei das freigesetzte 3H -Moenomycin als lösliche Verbindung vom fixierten Komplex abgetrennt und die verbliebene Radioaktivität mit einem Geigerzähler gemessen werden kann.

10

Tabelle 1: Die Hemmkonstanten (IC_{50} -Werte) der erfindungsgemäßen Antibiotika im Glycosyltransferase Assay.

Serpentemycin A:	0.2 μM
Serpentemycin B:	0.1 μM
Serpentemycin C:	21 μM
Serpentemycin D:	19 μM

15

Zum Vergleich wurde die Hemmkonstante von Serpentene (Ritzau et al., Liebigs Ann. Chem. 1993, 433-435) bestimmt: der IC_{50} -Wert betrug 18 μM .

20

Die vorliegende Erfindung betrifft demzufolge auch die Verwendung einer Verbindung der Formel (I) als Arzneimittel, vorzugsweise zur Behandlung und/oder zur Prophylaxe von bakteriellen Infektionen.

25

Die Erfindung betrifft ferner sowie die Verwendung einer Verbindung der Formel (I) zur Herstellung eines Arzneimittels, vorzugsweise zur Behandlung und/oder zur Prophylaxe von bakteriellen Infektionen.

30

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel mit einem Gehalt an einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Verbindungen.

Das besagte Arzneimittel wird durch Mischung von mindestens einer Verbindung der Formel (I) mit einem oder mehreren physiologischen geeigneten Hilfsstoffen hergestellt und in eine geeignete Darreichungsform gebracht.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden im allgemeinen oral, lokal oder parenteral verabreicht, aber auch eine rektale Anwendung ist prinzipiell möglich.

Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Tabletten, Dragees, (Mikro-)Kapseln, Zäpfchen, Sirupe,

- 5 Emulsionen, Suspensionen, Aerosole, Tropfen oder injizierbare Lösungen in Ampullenform sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung üblicherweise physiologisch geeignete Hilfsmittel wie Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel oder Lösungsvermittler Verwendung finden. Als häufig verwendete Hilfsstoffe seien
- 10 z.B. Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Mischeiweiß, Gelatine, Stärke, Vitamine, Cellulose und ihre Derivate, tierische oder pflanzliche Öle, Polyethylenglykole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser, Alkohole, Glycerin und mehrwertige Alkohole genannt.

- 15 Gegebenenfalls können die Dosierungseinheiten für die orale Verabreichung mikroverkapselt werden, um die Abgabe zu verzögern oder über einen längeren Zeitraum auszudehnen, wie beispielsweise durch Überziehen oder Einbetten des Wirkstoffs in Teilchenform in geeignete Polymere, Wachse oder dergleichen.

- 20 Als zweckmäßige Dosierung werden 0.1 - 1000, vorzugsweise 0.2 - 100 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Sie werden zweckmäßig in Dosierungseinheiten verabreicht, die mindestens die wirksame Tagesmenge der erfindungsgemäßen Verbindungen, z.B. 30 - 3000, vorzugsweise 50 - 1000 mg enthalten.

- 25 Die folgenden Beispiele sollen der näheren Erläuterung der Erfindung dienen, ohne die Breite der Erfindung in irgendeiner Weise zu begrenzen.

Beispiel 1 Herstellung einer Glycerinkultur von *Actinomyces* sp. DSM 14865

- 30 30 ml Nährlösung (Malzextrakt 1,0%, Hefeextrakt 0,4 %, Glucose 0,4 %, pH 7,0 in Wasser) in einem sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben wurden mit dem Stamm *Actinomyces* sp, DSM 14865, beimpft und 7 Tage bei 28° C und 180 UpM auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Je 1,5 ml dieser Kultur wurden anschließend mit 2,5 ml 80 %-igem Glycerin verdünnt und bei -135°C gelagert.

Beispiel 2 Herstellung einer Vorkultur im Erlenmeyerkolben von *Actinomycetes* sp, DSM 14865

Je 100 ml Nährlösung (Glukose 1,5 %, Sojamehl 1,5 %, Cornsteep 0,5 %, CaCO_3 0,2 % und NaCl 0,5 % pH 7,0) wurden in einem sterilen 300 ml Erlenmeyerkolben mit dem Stamm *Streptomyces* sp, DSM 14865, beimpft und 4 Tage bei 28° C und 180 UpM auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend zum Beimpfen der Hauptkulturen verwendet.

10 Beispiel 3 Bildungskinetik der aromatischen Polyencarbonsäuren der Schüttelkulturen des *Actinomyces* sp, DSM 14865.

Es wurden Kulturen des *Actinomycetes* sp, DSM 14865 in 20 Erlenmeyerkolben, wie in Beispiel 2 beschrieben, angesetzt und die Kulturen auf einer Schüttelmaschine bis über einen Zeitraum von 2 Wochen inkubiert. Nach 48, 72, 96, 102, 120, 240 und 312 Stunden wurden Schüttelkolben entnommen. Nach Abtrennen des Mycels, Festphasenextraktion der aromatischen Polyencarbonsäuren aus dem Kulturfiltrat mit MCI-Gel® (Mitsubishi Chemical Industries) und Elution mit Methanol wurden die Extrakte durch HPLC, wie in Beispiel 8 beschrieben, untersucht. In der folgenden Tabelle sind die Veränderungen der HPLC-Flächeneinheiten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgeführt. Die Flächeneinheiten sind proportional zu den Konzentrationen der Produkte.

Tabelle 2: Veränderung der Produktkonzentrationen mit der Inkubationszeit der *Actinomycetes* sp, DSM 14865, Schüttelkulturen. Die Produktkonzentrationen sind proportional zu den angegebenen HPLC-Flächeneinheiten.

Inkubationszeit	Serpentemycine				Serpentene
	A	B	C	D	
48h	174	132	151	54	574
72h	313	284	372	94	1948
96h	727	443	891	242	2530
102h	698	424	814	358	1878

120h	816	470	1098	430	1212
240h	917	1216	1786	1437	47
312h	882	1411	1877	734	35

Während Serpentene bereits nach 96 Stunden das Bildungsmaximum erreicht hat, sind die höchsten Konzentrationen des Serpentemycine A und D erst nach 10 Tagen zu beobachten. Die Produkte Serpentemycin B und C liegen sogar nach 13 Tagen in den höchsten Konzentrationen vor.

Beispiel 4 Fermentation des *Actinomycetales* sp. DSM 14865 zur Produktion von Serpentemycin A.

Die Fermentation des Stammes *Actinomycetales* sp. DSM 14865 zur Produktion der erfindungsgemäßen Antibiotika erfolgte in 30 L Fermentern. Als Nährlösung diente: 10 g/L lösliche Stärke; 10 g/L Glucose; 10 g/L Glycerin; 2.5 g/L Cornsteep, flüssig; 5 g/L Pepton; 2 g/L Hefe-extrakt; 1 g/L NaCl; 3 g/L CaCO₃ in Wasser; pH, vor dem Sterilisieren, 7.2. In diesem Nährmedium wurde gutes Wachstum und schnelle Produktivität beobachtet. Die Fermentation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Sterilisation : in-situ, 20 min bei T=121°C

Inokulum: 6 %

Rührgeschwindigkeit: 180 Upm

T: 28°C

Luft : 0,45 m³/h

pO₂ : keine Regelung,

pH, während der Fermentation: etwa 6,2; ohne Regelung.

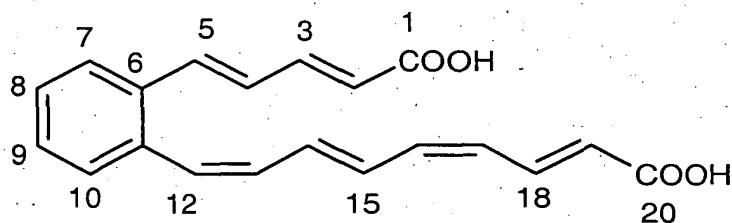
Unter diesen Bedingungen zeigte sich ein gutes Wachstum innerhalb der ersten 70h, zu diesem Zeitpunkt war die C-Quelle im Medium verbraucht und das Wachstum stagnierte. Nach 80 h konnte eine erste Produktbildung der erfindungsgemäßen Verbindungen nachgewiesen werden. Die Fermenter wurde nach der 98 h abgeerntet.

Beispiel 5: Isolierung des Serpentemycin A aus der Kulturlösung des *Actinomycetales* sp. DSM 14865.

Nach Beendigung der Fermentation von *Actinomycetales* sp. DSM 14865 wurden

- 5 27.5 Liter Kulturbrühe des Fermenters, gewonnen nach Beispiel 4, unter Zusatz von ca. 2 % Filterhilfsmittel (Celite®) filtriert und die Zellmasse (1890 g) mit 6 Liter Methanol extrahiert. Die Wirkstoffhaltige, methanolische Lösung wurde durch Filtration vom Mycel befreit und im Vakuum konzentriert. Das Konzentrat wurde mit 25 L des Kulturfiltrates vereinigt, der pH-Wert auf 7 eingestellt und auf eine
- 10 vorbereitete, 3 Liter MCI GEL, CHP20P-Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 50 mM NH₄-Acetat-Puffer in Wasser nach Propanol-2. Der Säulendurchfluß (7 Liter pro Stunde) wurde fraktioniert aufgefangen (je 2 Liter) und die Antibiotika enthaltenden Fraktionen 4 bis 11 sowie 16 bis 19 jeweils vereinigt und im Vakuum konzentriert. Mittels HPLC werden die Fraktionen untersucht. Die
- 15 Fraktion 4 bis 11 beinhaltet die polareren Serpentemycine, die Fraktion 16 bis 19 das Serpentene. Die Serpentene-enthaltenden Fraktionen wurden auf LiChrospher® 100 RP-18e, 250-25, HPLC-Säulen zweimal chromatographisch gereinigt, zuerst mit 50 mM NH₄-Acetat-Puffer / Acetonitril-Gemischen, dann mit 0.05% Trifluoressigsäure / Acetonitrilgradienten. Die Gefriertrocknung der reinen Antibiotikum
- 20 enthaltenden Fraktionen ergab 19 mg reines Serpentene.
- Die polareren Verbindungen der Fraktionen 4 bis 11 wurden, nachdem sie im Vakuum eingeeengt worden sind, erneut auf 160 mL MCI GEL® CHP20P säulenchromatographisch (Säulenmaße : 26 mm x 300 mm) im Gradientenverfahren gereinigt. Der Gradient reichte von 10% bis 60% Acetonitril in 50 mM NH₄-Acetat-
- 25 Puffer in 2 Stunden. Der Säulendurchfluß betrug 25 mL pro Minute, die Fraktionengröße 50 mL. In den Fraktionen 15 bis 35 befand sich die Verbindung Serpentemycin B und D, die Fraktionen 36 bis 39 beinhalteten Serpentemycin C und die Fraktionen 40 bis 43 Serpentemycin A. Letztere wurden im Vakuum vom organischen Lösungsmittel befreit, mit 0.01% Ascorbinsäure versetzt und auf einer
- 30 LiChrospher® 100 RP-18e, 250-25, HPLC-Säule isokratisch mit 45% Acetonitril in 0.05% Trifluoressigsäure chromatographisch gereinigt. Die Fraktionen, die reines Serpentemycin A enthielten (Fr. 31 bis 35) wurden unter Lichtausschluß gefriergetrocknet und in Argon-Atmosphäre luftdicht abgefüllt (37 mg). ESI⁻-Massenspektrometrie: 321.4 (M – H), ESI⁺-Massenspektrometrie: 305.3 (MH – H₂O).

UV-Maxima: 315 und 355 nm. Die NMR-Daten sind in der Tabelle 3 aufgeführt, wobei die Bezifferung der C-Atome wie folgt vorgenommen wurde:



5

Tabelle 3: NMR-chemische Verschiebungen von Serpente mycin A in DMSO bei 300° K.

	^1H	^{13}C
1	-	167.43
2	6.02	122.54
3	7.35	144.35
4	7.04	128.09
5	7.19	137.16
6	-	134.33
7	7.73	125.93
8	7.35	127.90
9	7.35	128.57
10	7.27	130.22
11	-	135.78
12	6.81	130.33
13	6.63	131.24
14	6.59	132.61
15	7.15	130.33
16	6.41	136.57
17	6.21	127.45
18	7.70	138.40
19	5.95	123.07
20	-	167.48

Serpentemycin A:

Aussehen: Zitronengelbe, in mittelpolaren und polaren organischen Lösungsmitteln lösliche, in Wasser wenig lösliche Substanz. Stabil in neutralem und mild saurem Milieu, jedoch unbeständig in stark-saurer und stark-alkalischer Lösung.

5 Serpentemycin A ist licht- und luftempfindlich.

Summenformel: $C_{20}H_{18}O_4$

Molekulargewicht: 322.36

Beispiel 6: Isolierung und Beschreibung des Serpentemycin B.

10

Die Serpentemycin B-haltigen Fraktionen 36 bis 39 der 160 mL MCI GEL® CHP20P – Säule, gewonnen nach Beispiel 4, wurden mit im Vakuum eingengt und die wässrige, noch etwas Acetonitril enthaltene Lösung auf eine LiChrospher® 100 RP-

15 in 0.05% Trifluoressigsäure (pH 2.4). Der Säulendurchfluß betrug 39 mL/Minute, es wurden Fraktionen je 19.5 mL abgenommen und mittels HPLC analysiert. Die

Fraktionen 22 bis 24 enthielten das Antibiotikum Serpentemycin B, sie wurden auf der selben Säule rechromatographiert, wobei die Acetonitril-Konzentration im Elutionsmittel auf 40% reduziert wurde. Die Fraktionen 38 bis 42 enthielten reines

20 Serpentemycin B, sie wurden gefriergetrocknet und ergaben 10.2 mg des

Antibiotikums. ESI-Massenspektrometrie: 295.0985 (M – H), ESI⁺-Massenspektrometrie: 297.1164 (M + H), entsprechend der Summenformel $C_{18}H_{16}O_4$. UV-

Maxima: 306 und 332 nm in Acetonitril/0.1% Phosphorsäure in Wasser. Die NMR-Daten sind in der Tabelle 4 aufgeführt, die Bezifferung der Atome ist analog der

25 Serpentemycin A-Numerierung.

Tabelle 4: NMR-chemische Verschiebungen von Serpentemycin B in DMSO bei 300° K.

	¹ H	¹³ C
1	-	167.42
2	6.02	122.59
3	7.35	144.32
4	7.05	128.23

5	7.19	137.09
6	-	134.40
7	7.74	126.00
8	7.36	128.10
9	7.36	128.61
10	7.28	130.31
11	-	135.40
12	6.90	131.86
13	6.53	130.54
14	6.81	135.71
15	6.65	132.89
16	7.19	143.79
17	5.93	122.69
18	-	167.33

Serpentemycin B:

Aussehen: Hellgelbe, in mittelpolaren und polaren organischen Lösungsmitteln lösliche, in Wasser wenig lösliche Substanz. Stabil in neutralem und mild saurem

- 5 Milieu, jedoch unbeständig in stark-saurer und stark-alkalischer Lösung.

Serpentemycin B ist licht- und luftempfindlich.

Summenformel: $C_{18}H_{16}O_4$

Molekulargewicht: 296.33

- 10 Beispiel 7: Isolierung und Beschreibung der Serpentemycin C.

45 Liter Kulturfiltrat, gewonnen nach Beispiel 3, wurden mit 450 mg Ascorbinsäure versetzt und auf eine 3.5 Liter MCI GEL® CHP20P – Säule (15 cm x 20 cm) bei pH 4.5 aufgetragen. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 0.1% NH_4 Acetat-Puffer, pH 4.5, nach Propanol-2. Der Durchfluß betrug 15 Liter/Stunde, Der Propanol-haltige Ausfluß wurde fraktioniert aufgefangen (je 7 Liter), die Fraktion 6 enthielt die polaren aromatischen Polyendicarbonsäuren. Sie wurde im Vakuum konzentriert, 50 mg Ascorbinsäure hinzugefügt, der pH-Wert der wässrigen Lösung auf 3 eingestellt und auf eine 490 mL MCI GEL® CHP20P – Säule (5 cm x 30 cm) aufgetragen. Mit einem

Gradienten von 10% Acetonitril in 0.5% Essigsäure nach 100% Acetonitril wurde die Desorption durchgeführt, bei einer Flußrate von 25 mL pro Minute betrug die Fraktionszeit 10 Minuten (je 250 mL). Die polaren aromatischen Polyendicarbonsäuren befanden sich in den Fraktionen 12 bis 19, sie wurden zusammengefasst im Vakuum konzentriert und mittels Gelpermeationschromatographie weiter gereinigt. Als Träger diente 3.9 L Fractogel® TSK HW-40 (Säulenmaße: 10 x 50 cm), als Laufmittel eine Mischung von 60% Acetonitril, 20% Methanol und 20% 25 mM NH₄-Acetat – Puffer, pH 7. Bei einem Durchfluß von 4.5 mL/Minute wurde halbstündlich fraktioniert (je 135 mL). Die durch HPLC überprüften Fraktionen 37 bis 40 beinhalteten die Verbindung Serpentemycin C. Die Endreinigung erfolgte auf LiChrospher® 100 RP-18e, 250-25 mit dem Laufmittel 50 mM NH₄-Acetat – Puffer, pH 7, / Acetonitril. Die reines Serpentemycin C enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und über LiChrospher® RP-18e, 250-10, mit Wasser / Acetonitril entsalzt. Die Gefriertrocknung ergab 15 mg Serpentemycin C-Ammoniumsalz. ESI⁻-Massenspektrometrie: 295.1 (M – H), ESI⁺-Massenspektrometrie: 279.2 (MH – H₂O), entsprechend der Summenformel C₁₈H₁₆O₄. UV-Maxima: 212, 308 und 356 nm in Acetonitril / 0.1% Phosphorsäure in Wasser (1:1). Die NMR-Daten sind in der Tabelle 5 aufgeführt, die Bezifferung der Atome ist analog der Serpentemycin A-Numerierung.

Tabelle 5: NMR-chemische Verschiebungen von Serpentemycin C in DMSO bei 300° K.

	¹ H	¹³ C
1	-	167.94
2	6.03	124.53
3	7.37	143.06
4	6.98	129.04
5	7.45	135.64
6	-	134.29
7	7.65	126.29
8	7.29	128.25
9	7.32	128.70
10	7.66	125.99

11	-	135.01
12	7.26	132.17
13	6.97	130.76
14	6.87	139.75
15	6.59	131.34
16	7.18	142.39
17	5.95	124.21
18	-	167.33

Serpentemycin C:

Aussehen: Hellgelbe, in mittelpolaren und polaren organischen Lösungsmitteln lösliche, in Wasser wenig lösliche Substanz. Stabil in neutralem und mild saurem Milieu, jedoch unbeständig in stark-saurer und stark-alkalischer Lösung.

Serpentemycin C ist licht- und luftempfindlich.

Summenformel: $C_{18}H_{16}O_4$

Molekulargewicht: 296.33

10 Beispiel 8: Isolierung und Beschreibung der Serpentemycin D.

Die Serpentemycin D-haltigen Fraktionen 36 bis 39 der 160 mL MCI GEL® CHP20P – Säule, gewonnen nach Beispiel 4, wurden im Vakuum eingedunstet und die wässrige, noch etwas Acetonitril enthaltene Lösung auf eine LiChrospher® 100 RP-18e, 250-25, HPLC-Säule aufgetragen. Eluiert wurde isokratisch mit 42% Acetonitril in 0.05% Trifluoressigsäure (pH 2.4). Der Säulendurchfluß betrug 39 mL/Minute, es wurden Fraktionen je 19.5 mL abgenommen und diese, wie in Beispiel 9 beschrieben, mittels HPLC analysiert. Die Fraktionen 51 bis 53 enthielten das Antibiotikum Serpentemycin D, sie wurden auf der selben Säule rechromatographiert, wie beschrieben, nur mit der Acetonitril-Konzentration im Elutionsmittel wurde auf 40% reduziert. Die Fraktionen 13 bis 15 enthielten reines Serpentemycin D, sie wurden gefriergetrocknet und ergaben 3 mg des Antibiotikums. ESI⁻-Massenspektrometrie: 325.5 (M – H), ESI⁺-Massenspektrometrie: 349.2 (M + Na), entsprechend der Summenformel $C_{20}H_{22}O_4$. UV-Maxima: 299 und 338 nm in Acetonitril/0.1% Phosphorsäure in Wasser. Die NMR-Daten sind in der Tabelle 6 aufgeführt, die Bezifferung der Atome geschah analog der Verbindung Serpentemycin A.

Tabelle 6: NMR-chemische Verschiebungen von Serpente mycin D in DMSO bei 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	167.54
2	6.02	122.38
3	7.45	144.49
4	6.99	128.31
5	7.49	136.82
6	-	133.56
7	7.64	126.22
8	7.25	127.52
9	7.31	128.84
10	7.62	125.68
11	-	135.74
12	7.07	128.14
13	6.89	131.72
14	6.48	132.12
15	6.45	134.02
16	6.30	129.68
17	5.90	136.71
18	3.82	75.31
18-OH	4.81 (breit)	-
19	3.48	69.77
19-OH	4.48 (breit)	-
20	1.03	19.10

Serpente mycin D:

- 5 Aussehen: Hellgelbe, in mittelpolaren und polaren organischen Lösungsmitteln lösliche, in Wasser wenig lösliche Substanz. Stabil in neutralem und mild saurem Milieu, jedoch unbeständig in stark-saurer und stark-alkalischer Lösung.

Serpente mycin D ist licht- und luftempfindlich.

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$

- 10 Molekulargewicht: 326.40

Beispiel 9: Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) der Serpentemycine.

Die HPLC wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule: Superspher 100 RP-18e®, 250-4, mit Vorsäule,

5 Mobile Phase: 50 % Acetonitril in 0.1% Phosphorsäure,

Flußgeschwindigkeit: 1 mL pro Minute,

Säulentemperatur: 40° C,

Detektion durch UV-Absorption bei 210 nm.

10 Folgende Retentionszeiten wurden beobachtet:

Serpentemycin A 10.1 Minuten,

Serpentemycin B 5.6 Minuten,

Serpentemycin C 7.3 Minuten,

Serpentemycin D 5.2 Minuten.

15 Beispiel 10: Bestimmung der Glycosyltransferase-Hemmung durch Serpentemycine .

Der Assay wurde entsprechend Vollmer & Höltje (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000, 44, 1181-1185) durchgeführt, wobei anstatt mit

[3H]Benzylpenicillin im vorliegenden Beispiel mit gereinigtem Penicillin Binding

20 Protein 1b (PBP 1b; 5 pM) durchgeführt, welches an der Glycosyltransferase-Stelle ³H-markiertes Moenomycin trägt. ³H-Moenomycin wird aus Moenomycin A (Kurz et al., Eur. J. Biochem., 1998, 252, 500-507) durch Hydrierung mit ³H₂ gewonnen:

In ein 1 cm³-Kolben wird 6 mg Moenomycin, gelöst in 300 µL Methanol, gegeben und 2 mg Palladium-Kohle (Degussa Type E10N/D) hinzugefügt. Dann wird unter

25 Luftausschluß mit 1 cm³ ³H₂ begast und die Reaktionslösung 15 Minuten hydrieren lassen. Nach Beenden der Reaktion wird die Reaktionsmischung vom Katalysator abfiltriert und mit Ethanol auf 100 mL verdünnt. Diese Lösung kann zur Herstellung des Glycosyltransferase / ³H-Moenomycin-Komplexes unmittelbar verwendet werden. Gesamt-Radioaktivität der Reaktionsproduktes: 6.56 GBq (177mCi),

30 Spezifische Aktivität: 1.9 TBq/mmol. Der radioaktive Komplex wird an SPA PVT Copper His-Tag – Perlen fixiert. Es wird das durch die Inhibitoren verdrängte radioaktive Moenomycin gemessen.

SPA PVT Copper His-Tag – Perlen: Amersham RPN 0095;

PBS: GIBCO BRL 14200-067;

BSA: Calbiochem 12657;

NOG: SIGMA O-8001 (n-Octyl β -D-glucopyranosid);

5 Tween 20: Acros 23336-067;

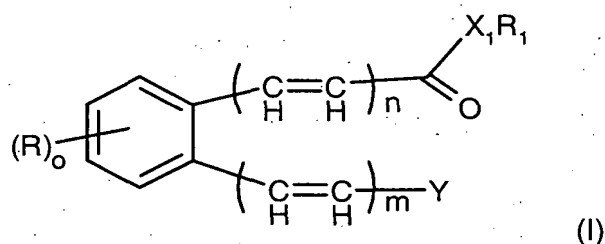
MikrotiterPlatten: Greiner Labortechnik;

- Die Bestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. In die Mikrotiterplatten wurden 10 μ L der Testlösung gegeben und 10 μ L 3 H-Moenomycin (25 nM, 3.1 kBq/Well) sowie 40 μ L SPA-Perlen, beladen mit PBP 1b, (100 μ g Perlen, 45 nM Enzym) versetzt. Die Platten wurden verschlossen und 8 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Perlen durch 3-minütiges Zentrifugieren bei 1300 Rpm von der Testlösung getrennt und die Verteilung der Radioaktivität einem WALLAC MicroBeta® 1450 Counter gemessen.
- 10
- 15 Die Berechnung der Hemmwerte erfolgte nach der Formel:

$$[1 - (\text{cpm}_{\text{sample}} - \text{cpm}_{\text{low ctr}}) / (\text{cpm}_{\text{high ctr}} - \text{cpm}_{\text{low ctr}})] \times 100 (\%).$$

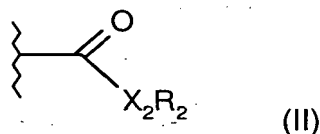
Patentansprüche:

5 1. Verbindung der Formel (I)

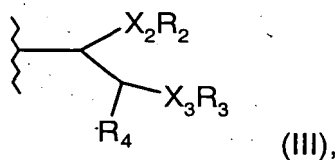


wobei

Y eine Gruppe der Formel (II)



oder der Formel (III)



R

H, C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl oder C₅-C₁₄-Aryl, Halogen, -CN, -OH, -O-C₁-C₆-Alkyl, -O-C₂-C₆-Alkenyl, -O-C₅-C₁₄-Aryl, -O-C₂-C₆-Alkynyl, -NH₂, -NH-C₁-C₆-Alkyl, -NH-C₂-C₆-Alkenyl, -NH-C₂-C₆-Alkynyl, -NH-C₅-C₁₄-Aryl, -N(-C₁-C₆-Alkyl)₂, -N(-C₂-C₆-Alkenyl)₂, -N(-C₂-C₆-Alkynyl)₂, -N(C₅-C₁₄-Aryl)₂, -NH[-C(=O)-(C₁-C₆-Alkyl)], -NH[-C(=O)-(C₅-C₁₄-Aryl)], -NH-O-R₁, -SH, -S-C₁-C₆-Alkyl, -S-C₂-C₆-Alkenyl, -S-C₁-C₆-Alkynyl oder -O-C₅-C₁₄-Aryl ist, wobei die oben genannten Substituenten unsubstituiert oder einfach oder mehrfach substituiert sein können mit C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl oder C₅-C₁₄-Aryl, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl unsubstituiert oder ein- oder zweifach substituiert sind durch -OH, =O, -O-C₁-C₆-

Alkyl, $-O-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-O-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-NH-C_1-C_6$ -Alkyl, $-NH-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-NH_2$, Halogen, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl weiter substituiert sein können durch eine $-CN$, Amid oder Oxim,

5 R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander

H, C_1-C_6 -Alkyl, C_2-C_6 -Alkenyl, C_2-C_6 -Alkynyl oder C_5-C_{14} -Aryl bedeuten, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl unsubstituiert oder ein- oder zweifach substituiert sind durch $-OH$, $-O-C_1-C_6$ -Alkyl, $-O-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-O-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-NH-C_1-C_6$ -Alkyl, $-NH-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-NH_2$ oder Halogen, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl unsubstituiert oder ein- oder zweifach substituiert sind durch $-OH$, $=O$, $-O-C_1-C_6$ -Alkyl, $-O-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-O-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-C_5-C_{14}$ -Aryl, $-NH-C_1-C_6$ -Alkyl, $-NH-C_2-C_6$ -Alkenyl, $-NH_2$, Halogen, worin Alkyl, Alkenyl, Alkynyl und Aryl weiter substituiert sein können durch eine $-CN$, Amid oder Oxim,

15 X_1 , X_2 und X_3 unabhängig voneinander

$-CH_2-$, $-CHR-$, $-NH-$, $-N(C_1-C_6-Alkyl)-$, $-N(C_2-C_6-Alkenyl)-$, $-N(C_2-C_6-Alkynyl)-$, $-N[-C(=O)-(C_1-C_6-Alkyl)]-$, $-N[-C(=O)-(C_5-C_{14}-Aryl)]-$, $-N(C_5-C_{14}-Aryl)-$, $-N(O-R)-$, $-O-$ oder $-S-$ sind,

20 n und m unabhängig voneinander

2, 3, 4 oder 5 sind, und

o

0, 1, 2 oder 3 ist,

25

wobei Verbindungen der Formel (I) ausgenommen sind, in denen

o gleich 0,

n gleich 2,

m gleich 2 oder 3,

30 X_2 und X_3 gleich O und

R_2 und R_3 gleich C_2H_5 sind,

und alle Doppelbindungen die trans-Konfiguration besitzen,

und/oder eine stereoisomere Form der Verbindung der Formel (I) und/oder ein Gemisch dieser Formen in jedem Verhältnis, und/oder ein physiologisch verträgliche Salze der Verbindung der Formel (I).

5 2. Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 1, wobei mindestens eine Polyengruppe mindestens eine *cis*-Doppelbindung enthält.

3. Verbindung der Formel (I) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei R H,

10 R₁ H oder C₁-C₆-Alkyl,

R₂ H oder C₁-C₆-Alkyl,

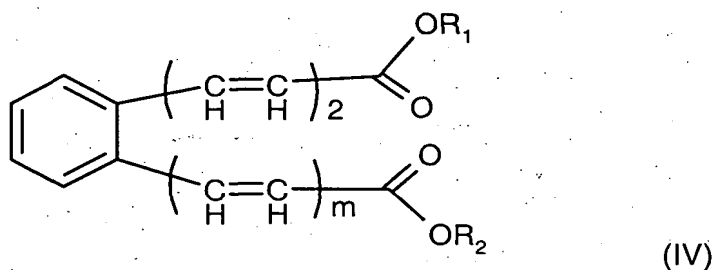
R₃ H oder C₁-C₆-Alkyl,

R₄ C₁-C₆-Alkyl, und

X₁ und X₂-O- sind,

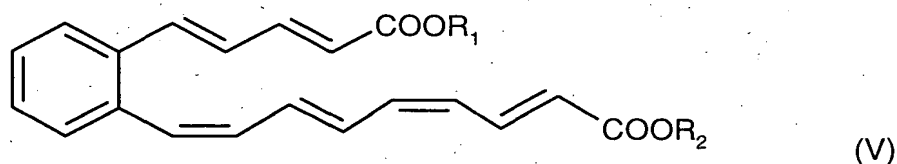
15 sowie deren physiologisch verträglichen Salze.

4. Verbindung der Formel (I) gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (IV)



wobei m 3 oder 4 ist, sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

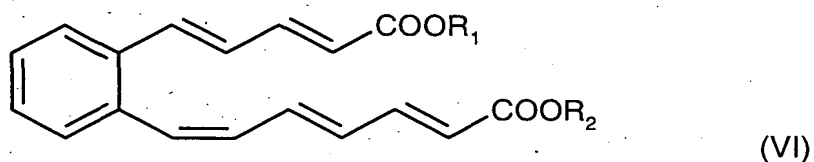
5. Verbindung der Formel (I) gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (V)



6. Verbindung der Formel (V) gemäß Anspruch 5, wobei R_1 und R_2 gleich H sind.

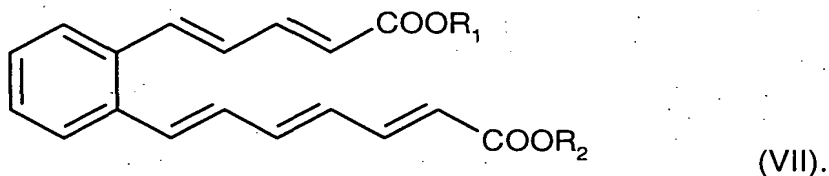
7. Verbindung der Formel (I) gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (VI)

5



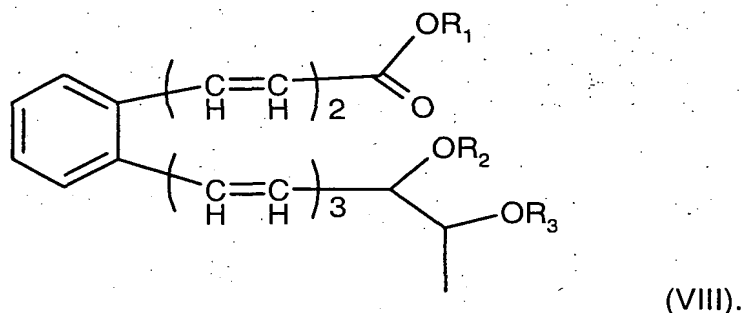
8. Verbindung der Formel (VI) gemäß Anspruch 7, wobei R_1 und R_2 gleich H sind.

9. Verbindung der Formel (I) gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (VII)



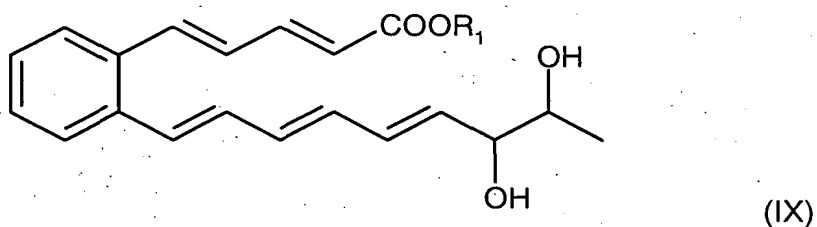
10. Verbindung der Formel (VII) gemäß Anspruch 9, wobei R_1 und R_2 gleich H sind.

11. Verbindung der Formel (I) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (VIII)



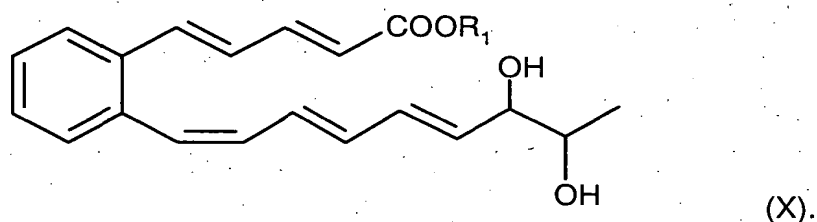
20

12. Verbindung der Formel (VIII) gemäß Anspruch 11, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (IX)



13. Verbindung der Formel (IX) gemäß Anspruch 12, wobei R_1 gleich H ist.

- 5 14. Verbindung der Formel (VIII) gemäß Anspruch 11, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (X)



- 10 15. Verbindung der Formel (X) gemäß Anspruch 14, wobei R_1 gleich H ist.

16. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

1. der Mikroorganismus *Actinomyces* sp. DSM 14865 bzw. einer ihrer Varianten und/oder Mutanten in einem wäßrigen Nährmedium kultiviert wird, bis sich eine oder mehrere der Verbindungen Serpentemycin A, B, C und/oder D in der Kulturbrühe anhäuft,
2. Serpentemycin A, B, C oder D isoliert und gereinigt wird,
3. Serpentemycin A, B, C oder D gegebenenfalls mit einem geeigneten Reagenz in eine Verbindung der Formel (I) überführt wird,
4. und die Verbindung der Formel (I) gegebenenfalls in ein pharmakologisch verträgliches Salz überführt wird.

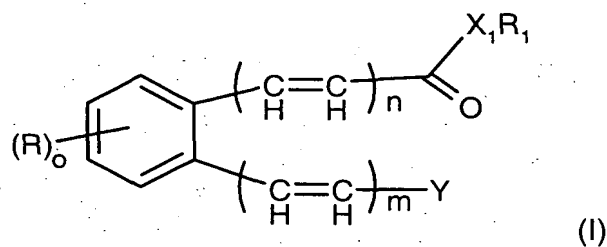
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei das geeignete Reagenz ein Alkylierungsmittel ist.

18. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus *Actinomycetales* sp. DSM 14865, oder einer seiner Varianten und/oder Mutanten in einem eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie die üblichen anorganischen Salze und Spurenelemente enthaltenden Kulturmedium fermentiert wird, Serpentemycine A, B, C und/oder D isoliert wird, und Serpentemycine A, B, C und/oder D gegebenenfalls in ein pharmakologisch verträgliches Salz überführt wird.
19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur zwischen 20 und 35°C und bei einem pH zwischen 4 und 10 durchgeführt wird.
20. Verwendung einer Verbindung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels.
21. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 20 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bakteriellen Infektionskrankheiten.
22. Arzneimittel mit einem Gehalt an mindestens einer Verbindung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15 und einem oder mehreren physiologisch geeigneten Hilfsstoffen.
23. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Verbindung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15 mit einem oder mehreren physiologisch geeigneten Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform gebracht wird.
24. Mikroorganismus *Actinomycetales* sp., DSM 14865.

Zusammenfassung

5 Polyencarbonsäure-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige, Serpentermycine genannte Verbindungen der Formel (I)



worin Y, R, R₂, R₃, R₄, X, X₂, X₃, n, m und o die angegebenen Bedeutungen haben, die von dem Mikroorganismus, *Actinomycetales* sp. DSM 14865, während der Fermentation gebildet werden, chemische Derivate der Serpente mycine, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung derselben als Arzneimittel, insbesondere zur Behandlung und Prophylaxe von bakteriellen Infektionskrankheiten.

15 Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung derselben als Arzneimittel,
insbesondere zur Behandlung und Prophylaxe von bakteriellen
Infektionskrankheiten.